



**BEST AVAILABLE COPY**

**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung  
einer Patentanmeldung**

**Aktenzeichen:** 198 14 682.5

**Anmeldetag:** 01. April 1998

**Anmelder/Inhaber:** Professor Dipl.-Phys. Dr. Jürgen Wolfrum,  
37124 Rosdorf/DE; Dr. rer.nat. Markus Sauer,  
69124 Heidelberg/DE; Kyung-Tae Han,  
71543 Wüstenrot/DE.

**Bezeichnung:** Verfahren und Vorrichtung zur Quantifizierung  
von DNA und RNA

**IPC:** C 12 Q, G 01 N

**Die Akte dieser Patentanmeldung ist ohne vorherige Offenlegung vernichtet  
worden.**

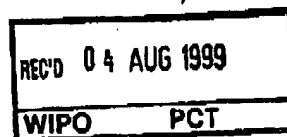
München, den 28. Juli 2004  
Deutsches Patent- und Markenamt  
Der Präsident  
Im Auftrag

*Stemme*

PCT/EP 99/02242<sup>5</sup>  
**BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND**

EP99/2242

**PRIORITY DOCUMENT**  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)



### **Bescheinigung**

Die Herren Professor Dr. rer. nat. Jürgen Wolfrum in Rosdorf/Deutschland,  
Dr. rer. nat. Markus Sauer in Heidelberg, Neckar/Deutschland und Dr. rer. nat.  
Kyung-Tae Han in Wüstenrot/Deutschland haben eine Patentanmeldung unter  
der Bezeichnung

"Verfahren und Vorrichtung zur Quantifizierung von DNA und RNA"

am 1. April 1998 beim Deutschen Patent- und Markenamt eingereicht.

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprüng-  
lichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

Die Anmeldung hat im Deutschen Patent- und Markenamt vorläufig die Symbole  
C 12 Q und G 01 N der Internationalen Patentklassifikation erhalten.

München, den 13. Juli 1999

**Deutsches Patent- und Markenamt**

Der Präsident  
Im Auftrag

Nietzsch

Aktenzeichen: 198 14 682.5

1. April 1998

4026



5/8 w/d

---

## ZUSAMMENFASSUNG

---

Vorrichtung und Verfahren zur Detektion, insbesondere Online-Detektion, einer Amplifizierung einer DNA- und/ oder RNA-Sequenz in einer Probe, wobei eine

- 5 Bewertung der Amplifizierung der DNA- und/ oder RNA-Sequenz in der Probe aufgrund eines Streulichtsignals der Probe erfolgt.

1. April 1998

40267

Belegexemplar

Darf nicht geändert werden

S/gwld

## VERFAHREN UND VORRICHTUNG ZUR QUANTIFIZIERUNG VON DNA UND RNA

Die Erfindung betrifft ein Verfahren und eine Vorrichtung zur Quantifizierung von DNA und RNA Sequenzen. Insbesondere betrifft die Erfindung ein Verfahren und eine Vorrichtung zur Detektion einer Amplifizierung einer DNA- und/ oder RNA-Sequenz in einer Probe, insbesondere die Online-Detektion einer Amplifizierung einer DNA- und/ oder RNA-Sequenz in einer Probe.

Der Nachweis von speziellen DNA und RNA Sequenzen, die sich in einer Probe befinden, durch die Versetzung der Probe mit einer komplementären DNA bzw. RNA Sequenz ist ein übliches diagnostisches Verfahren. Für die Bewertung des Ergebnisses ist es erforderlich, daß der Amplifizierungsvorgang beobachtet oder nachgewiesen werden kann. Bevorzugt geschieht dies quantifiziert im Verlauf der Amplifizierung.

Beim ABI-TaqMan-Verfahren wird nach dem Prinzip des Fluoreszenzenergietransfers gearbeitet. Die TaqMan-Sonde (ein Oligonukleotid, das am Template dort hybridisiert, bis dahin das Template während der PCR-Reaktion aufgebaut wird) wird am 5- bzw. 3- Ende des Oligonukleotids mit einem Donor- bzw. Akzeptorfarbstoff markiert. Dadurch ist nur die Akzeptorfluoreszenz detektierbar, die Donorfluoreszenz wird durch den Energietransfer zum Akzeptor gelöscht. Nach erfolgreichem Aufbau des Templates während der PCR-Reaktion wird die 5- terminale Base der TaqMan-Sonde abverdaut. Dadurch geht der räumlich nahe, fixierte Kontakt zum Akzeptorfarbstoff verloren und das Fluoreszenzsignal steigt. Für die Referenzierung wird zusätzlich noch ein freier Farbstoff, der bei einer anderen Wellenlänge emittiert, der Lösung zugesetzt.

Nachteilig an diesem Verfahren ist, daß die Probe durch die Beigabe von Fluoreszenzfarbstoffen, die für die eigentliche Messung erforderlich sind, verunreinigt wird. Eine Weiterverarbeitung der Probe ist nicht direkt möglich. Dadurch erforderliche

1. April 1998

40261 6  
S/gw/kt

Reinigungsschritte bergen das Risiko in sich, daß die Probe durch die fehlgeschlagene Reinigung unbrauchbar wird.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es daher ein Verfahren und eine Vorrichtung zur Quantifizierung von DNA und RNA Sequenzen bereitzustellen, die im Online-Betrieb  
5 einfacher und effizienter als die Verfahren und Vorrichtungen des Standes der Technik eingesetzt werden können.

Diese Aufgabe wird durch das Verfahren und die Vorrichtung nach den unabhängigen Ansprüchen gelöst. Weitere vorteilhafte Ausgestaltungen sind in den abhängigen Ansprüchen angegeben.

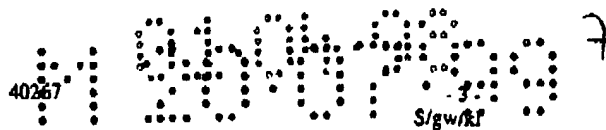
Insbesondere wird die Aufgabe durch ein Verfahren zur Online-Detektion einer Amplifizierung einer DNA- und/oder RNA-Sequenz in einer Probe gelöst, bei der eine Bewertung der Amplifizierung der DNA- und/oder RNA-Sequenz in der Probe aufgrund eines Streulichtsignals der Probe erfolgt. Es war hierbei überraschend gefunden worden, daß die Amplifikation von DNA oder RNA ohne Zusätze online detektiert werden  
15 konnten. Hierbei wurde das Streulichtsignal der RNA oder DNA-Moleküle ausgenutzt. Das erfindungsgemäße Verfahren beruht auf der Tatsache, daß die Intensität der Rayleigh-Streuung (Teilchengröße  $\ll \lambda$ , Wellenlänge des Lichtes) proportional zur Lichtintensität  $I_0$ , der Molekülgröße  $M_c$  und der Konzentration  $c$  der Teilchen ist.

$$I = I_0 M_c c$$

20 Durch die Ausnutzung des Streulichtsignals ist es somit nicht mehr nötig, Fluoreszenzfarbstoffe wie FAM, JOE, TAMRA und ROX einzusetzen. Durch eine kontinuierliche Erfassung des Streulichtsignals kann eine quantitative Aussage zur Amplifizierung vorgenommen werden.

Bei einem weiteren bevorzugten erfindungsgemäßen Verfahren wird die Probe durch eine  
25 Quelle angeregt, wobei die Quelle eine Lichtquelle, bevorzugt eine Lampe, ein Laser oder

1. April 1998



eine Leuchtdiode ist. Besonders bevorzugt wird eine Xenonlampe oder ein Helium-Neonlaser eingesetzt. Bei dieser bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung können die Quellen unterschiedlichster Emissionsspektren eingesetzt werden, da die Information aus dem Streulichtsignal gewonnen wird. Es ist daher nicht wie bei den Verfahren des Standes der Technik notwendig, daß eine spezielle Laserlichtquelle eingesetzt werden muß.

Bei dem weiteren bevorzugten Ausführungsbeispiel der vorliegenden Erfindung ist ein Verfahren vorgesehen, bei dem das Streulichtsignal zur Streulichtintensität korrespondiert. Eine derartige Korrespondenz kann mit Hilfe eines Detektors, besonders bevorzugt einer Pin-Diode, registriert werden. Damit ist es möglich, die Amplifizierung quantitativ zu bestimmen.

Das erfindungsgemäße Verfahren weist aufgrund seiner Einfachheit mehrere Vorteile auf. Es muß kein Primer oder Nukleotid markiert werden und die Probe kann anschließend ohne Reinigungsschritte direkt weiterverarbeitet werden. Die Reaktion über die Streulichtintensität kann online detektiert werden und ermöglicht so eine sicherere, einfachere und kostenbewußtere Möglichkeit der Detektion einer Amplifizierung. Bevorzugt ist es auch möglich, die Amplifizierung durch eine Anfangs- und Endpunktbestimmung zu überprüfen.

Bei einem weiteren bevorzugten Verfahren der vorliegenden Erfindung enthält die Probe Verunreinigungen, insbesondere sind fremde DNA- und/oder RNA-Sequenzen in der Probe vorhanden. Während bei Absorptionssmessungen die zugesetzten Mononukleotide eine Verfolgung der Amplifikation verhindern, wurde überraschend festgestellt, daß die zugesetzten Mononukleotide eine Streulichtintensitätsmessung nicht beeinflussen. Daher wurde als weiterer Vorteil der vorliegenden Erfindung gefunden, daß das erfindungsgemäße Verfahren eine Amplifizierung einer gewünschten DNA- und/oder RNA-Sequenz in einer Probe auch dann detektieren kann, wenn „fremde“ DNA, RNA

1. April 1998

40367

9504200  
S/gw/kl

und/oder Proteine vorhanden sind, da nur die Zunahme der Streulichtintensität gemessen wird. Bei einer Online-Detektion der Amplifizierung können sich somit beispielsweise die Viskosität und/oder andere Eigenschaften der Lösung verändern, ohne daß das erfindungsgemäße Verfahren dadurch beeinflußt würde. Besonders bevorzugt wird das

- 5 Verfahren daher auch zur Detektion, insbesondere Online-Detektion, bei einer Amplifizierung einer DNA- und/oder RNA-Sequenz in einer im übrigen verunreinigten Probe durchgeführt. Es sind daher Selbstmessungen in DNA- oder RNA-Proben möglich, die aus Zellkulturen entnommen wurden und im Überschuß „fremd“ - DNA bzw. RNA enthalten.

Bei einem weiteren bevorzugten Ausführungsbeispiel der vorliegenden Erfindung ist ein Verfahren vorgesehen, bei dem für bekannte Ausgangs- oder Endkonzentrationen von Produkten oder Edukten eine quantitative Bestimmung der Produkte und/oder Edukte erfolgt. Neben der nicht selektiven, qualitativen Aussage, ob eine Amplifikation stattgefunden hat, erlaubt das erfindungsgemäße Verfahren ebenso eine quantitative

- 15 Bestimmung der Produkte oder Edukte. Bevorzugt wird dafür eine Echtzeit-Detektion (Online) vorgesehen. Für diese Aussage werden bevorzugt die Ausgangs- oder Endkonzentrationen der Produkte/Edukte mitberücksichtigt.

Das erfindungsgemäße Verfahren kann sowohl für temperature cycling Amplifizierung (polymerase chain reaction PCR (RT-PCR), ligase chain reaction LCR, transcription-based amplification), als auch für isotherme Amplifizierungen (strand displacement amplification, nucleic acid sequence based amplification NASBA, Q $\beta$ -replicase system)

und weitere Amplifizierungsreaktionen eingesetzt werden.

Die Aufgabe wird weiterhin durch eine Vorrichtung zur Quantifizierung einer Amplifizierung einer DNA- und/oder RNA-Sequenz in einer Probe gelöst, die folgende

- 25 Komponenten umfaßt: eine Einrichtung zur Anregung der Probe und eine Detektionseinrichtung, wobei durch die Detektionseinrichtung ein Streulichtsignal aus der

1. April 1998

40367 9  
S/gw/kl

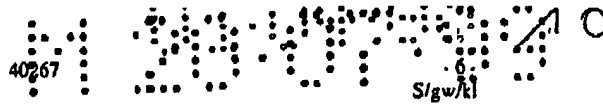
Probe detektierbar ist. Mit dieser Vorrichtung zur Streulichtmessung wurde überraschend gefunden, daß eine Aussage über die Amplifizierung der DNA- und/ oder RNA-Sequenz in einer Probe möglich ist.

Bei einem weiteren vorteilhaften Ausführungsbeispiel der vorliegenden Erfindung umfaßt  
5 die Einrichtung zur Anregung eine Lichtquelle bevorzugt eine Lampe, einen Laser oder besonders bevorzugt eine Leuchtdiode. Bei dieser bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung können die Quellen unterschiedlichster Emissionsspektren eingesetzt werden, da die Information aus dem Streulichtsignal gewonnen wird. Es ist daher nicht wie bei den Verfahren des Standes der Technik notwendig, daß eine Laserlichtquelle mit spezieller Frequenzbreite eingesetzt werden muß.

Eine weitere bevorzugte Ausführungsform zeichnet sich dadurch aus, daß die Detektionseinrichtung einen Photomultiplier (PMT) und/ oder eine CCD-Kamera und/ oder eine Diode umfaßt, insbesondere eine Avalanchephotodiode (APD) und/ oder mindestens eine PIN-Diode (16). Mit einem Photomultiplier und/ oder einer CCD-  
15 Kamera und/ oder einer Diode ist die Erfassung des Streulichtsignals möglich. Bevorzugt wird eine Kombination von verschiedenen geschalteten PIN-Dioden verwendet, wodurch der speziellen Meßsituation der einzelnen Detektionseinrichtungen Rechnung getragen werden kann. So ist es möglich, daß durch den Einsatz von Filtern Streulichtsignale vorbestimmter Frequenzbereiche bevorzugt detektiert werden. Es ist ebenfalls möglich, daß die Signale von verschiedenen PIN-Dioden erfaßt werden und erst eine Kombination dieser verschiedenen Signale das Endsignal definiert. Als Detektionseinrichtung kann  
20 ebenfalls an eine Bilderfassungseinrichtung gedacht werden, bevorzugt an eine CCD-Kamera. Vorteilhafterweise werden bevorzugt ein PMT und/ oder ein ADP eingesetzt, wenn geringere Substanzmengen detektiert werden sollen, da diese sehr empfindlich  
25 sind.



1. April 1998

40267  SigwAl

Eine weitere bevorzugte Vorrichtung der vorliegenden Erfindung umfaßt weiter eine Abscanneinrichtung. Mit dieser Abscanneinrichtung ist es möglich, daß ein spezielles Streulichtsignal aus der Probe an die Detektionseinrichtung übergeben werden kann. Bei diesem bevorzugten Ausführungsbeispiel der Erfindung ist somit eine gezielte Übergabe  
5 der Streulichtsignale der speziellen Probe an einen speziellen Detektor möglich.

Bei einer weiteren bevorzugten Vorrichtung der Erfindung sind mehrere Probenträger, bevorzugt Microtiterplatten oder Kapillaren, vorgesehen. Damit ist es möglich, mehrere Proben in einem Arbeitsgang zu beobachten und bevorzugt abzuscannen. Es sind dadurch effizientere Beobachtungs- und Detektionsmöglichkeiten gegeben. Es können außerdem Serien an Proben simultan beobachtet werden und damit zusammengehörige Messungen auf einmal abgearbeitet werden.

Eine weitere bevorzugte erfindungsgemäße Vorrichtung weist Probenträger auf, die mit der Abscanneinrichtung abgescannt werden können. Dadurch ist es möglich, daß die Probenträger beispielsweise in x-y-Richtung abgescannt werden können. Dabei befinden  
15 sich die Proben in den Probenträgern bevorzugt in einer Ebene und werden nacheinander durch die Abscanneinrichtung angefahren und gemessen. Ebenso ist es möglich, daß die Probenträger als solche beweglich ausgebildet sind und so bewegt werden, daß eine Probe nach der anderen durch die Abscanneinrichtung erfaßt werden kann. Außerdem ist es bevorzugt, wenn sowohl die Probenträger als auch die Abscanneinrichtung beweglich  
20 ausgebildet sind, so daß ein Austausch der Probenträger und ein Verschwenken der Abscanneinrichtung zu einer optimalen Ausnutzung der Rüst- und Beschickungszeiten der erfindungsgemäßen Vorrichtung führt. So kann der feststehende Probenträger durch die bewegliche Abscanneinrichtung abgescannt werden und danach die Abscanneinrichtung zu einem weiteren Feld an Probenträgern bewegt werden, während  
25 die ersten Probenträger weiterbehandelt oder ausgetauscht werden.

1. April 1998

40257

S/gw/kl

Eine bevorzugte weitere erfindungsgemäße Vorrichtung sieht eine Abscanneinrichtung vor, die einen bevorzugt beweglichen Spiegel umfaßt, über den ein Abtaststrahl der Abscanneinrichtung gerichtet werden kann. Auf diese Weise ist es möglich, daß die Abscanneinrichtung an sich fixiert ist und nicht bewegt werden muß, aber auch die Probensträger nicht bewegt werden müssen. Es reicht in diesem bevorzugten Ausführungsbeispiel aus, daß der Spiegel bewegt wird und dadurch die entsprechenden Streulichtsignale der einzelnen Proben in den Probensträgern an die Detektionseinrichtung weitergegeben werden. Hierbei ist es bevorzugt vorgesehen, daß die Probensträger in einer vorbestimmten Reihenfolge besonders bevorzugt zyklisch abgescannt werden und dadurch mittels der bekannten Position des Spiegels für jede Probe eine quasi-kontinuierliche Erfassung des Streulichtsignals möglich ist. So kann beispielsweise zu einer Zeit  $t_1$  ein Probensträger P1 erfaßt werden, zu einer Zeit  $t_1 + T$  ein Probensträger P2, etc. bis zum Zeitpunkt  $t_1 + NT$  wieder der Probensträger P1 erfaßt wird, wobei N die Anzahl der zu erfassenden Probensträger P und T die Zeit der Messung und der Erfassung der folgenden Probe darstellt. Damit ergibt sich für die spezielle Probe x in dem Probensträger Px eine quasi-kontinuierliche Erfassung der Streulichtsignale und damit des Verlaufs der Amplifizierung einer DNA- und/ oder RNA-Sequenz in einer Probe x mittels Interpolation der Meßwerte der Probe x zu den Zeiten

$$t_x, t_x + NT, t_x + 2NT, \dots, t_x + iNT \text{ etc.}$$

Eine weitere bevorzugte Ausführungsform der vorliegenden Erfindung stellt eine Vorrichtung dar, bei der die Einrichtung zur Anregung so ausgestaltet ist, daß die Probensträger bzw. Proben großflächig anregbar sind und die zu den einzelnen Probensträgern korrespondierenden Streulichtsignale durch die Detektionseinrichtung einzeln erfaßbar sind. Hierdurch ist es möglich, daß eine großflächige Probe bzw. Probenfelder bzw. auf großer Fläche verteilte Probensträger simultan erfaßt und ausgewertet werden können. Es genügt dabei die stetige diffuse Anregung des Probenfeldes, da für jede Probe bzw. jeden Ausschnitt des Probenfeldes die relative

1. April 1998

40257 12  
S/gw/kj

Streulichtintensität erfaßt wird, die von dem absoluten Streulichtsignal an dieser Stelle unabhängig ist.

Bei einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung ist eine Vorrichtung vorgesehen, bei der die Detektionseinrichtung mindestens zwei einzelne  
5 Detektoren umfaßt, wobei durch die einzelnen Detektoren unterschiedliche Streulichtsignale erfaßbar sind. Auf diese Weise ist es möglich, daß mehrere Proben simultan und nicht leicht zeitversetzt erfaßt werden können. Dies ist insbesondere dann vorteilhaft, wenn eine genau parallele Auswertung der Proben gewünscht ist. Besonders bevorzugt werden die einzelnen Detektoren über Lichtwellenleiter mit den Probeträgern bzw. Proben verbunden, so daß mit Hilfe eines Lichtwellenleiterbündels auch Profile von Probenfeldern erfaßt werden können. Bevorzugt ist ebenfalls daran zu denken, daß ein großflächiges Probenfeld mittels einer CCD-Kamera aufgezeichnet wird und die Detektion der Streulichtsignale an den einzelnen Stellen mittels der Auswertung des Bildes, bevorzugt über eine Steuereinrichtung durchgeführt wird, besonders bevorzugt  
15 über einen Rechner oder einen Computer, besonders bevorzugt über ein Bildverarbeitungssystem.

Bevorzugt ist weiter eine Steuereinheit vorgesehen ist, zu der Signale übertragbar sind: die zu den erfaßten Streulichtsignalen korrespondieren und diese von der Steuereinheit auswertbar sind. Durch diese Steuereinheit können die einzelnen Meßwerte in den entsprechenden Matrizen für die einzelnen Proben verarbeitet werden und an eine Speichereinheit zur Speicherung weitergegeben werden. Darüber hinaus kann über die  
20 Steuereinheit die Steuerung eines Abrastscanners vorgenommen werden und es können die Detektoren eingestellt werden bezüglich beispielsweise der der Empfindlichkeit und der Ausrichtung auf die Proben hin.

1. April 1998

40267 99017904  
S/gw/kl

Daneben besteht eine vorteilhafte Anwendung der vorliegenden Erfindung darin, daß eine Vorrichtung zur Streulichtmessung zur Quantifizierung einer Amplifizierung einer DNA- und/ oder RNA-Sequenz in einer Probe vorgenommen wird.

Im folgenden sollen weitere vorteilhafte Ausgestaltungen der Erfindung an Hand der Zeichnung erläutert werden. Hierbei zeigt

Fig. 1 ein Diagramm einer Streulichtintensitätsmessung nach einem Ausführungsbeispiel eines erfindungsgemäßen Verfahrens bei einer gegebenen Konzentration (a) und ein Diagramm einer Streulichtintensitätsmessung nach einem Ausführungsbeispiel des erfindungsgemäßen Verfahrens aus (a) bei zwei verdünnten Konzentration und einer Blindprobe (b);

Fig. 2 ein Diagramm, das eine Vergleichsmessung zwischen einer Fluoreszenzmessung nach TaqMan nach dem Stand der Technik und der erfindungsgemäßen Streulichtmessung umfaßt (a) und ein Diagramm, das eine Vergleichsmessung zwischen einer Fluoreszenzmessung durch Interkalationsfarbstoff nach dem Stand der Technik und der erfindungsgemäßen Streulichtmessung zeigt (b);

Fig. 3 einen schematischen Aufbau eines Ausführungsbeispiels der erfindungsgemäßen Vorrichtung mit einer Probe;

Fig. 4 einen schematischen Aufbau eines Ausführungsbeispiels der erfindungsgemäßen Vorrichtung mit einer Vielzahl von Proben bzw. Probenträgern und einer Abscanneinrichtung; und

Fig. 5 einen schematischen Aufbau eines Ausführungsbeispiels der erfindungsgemäßen Vorrichtung mit einer Vielzahl von Proben bzw. Probenträgern und Lichtwellenleitern

Fig. 1 a zeigt ein Diagramm einer Streulichtintensitätsmessung nach einem Ausführungsbeispiel eines erfindungsgemäßen Verfahrens bei einer gegebenen Konzentration. Deutlich zu erkennen ist der Anstieg der relativen Streulichtintensität mit der Zeit. Dieser Verlauf repräsentiert die voranschreitende Amplifizierung innerhalb der

5 Probe.

In Fig 1 b ist ein Diagramm einer Streulichtintensitätsmessung nach einem Ausführungsbeispiel des erfindungsgemäßen Verfahrens aus Fig. 1 a bei zwei verdünnten Konzentration (Kurven A und B) dargestellt. Darüber hinaus ist der Verlauf einer Blindprobe (Kurve C) dargestellt. Dadurch wird erkenntlich, daß mit einer Streulichtintensitätsmessung ebenfalls eine qualitative Aussage aufgrund der relativen Streulichtintensität getroffen werden kann. Im Falle der Blindprobe (Kurve C) ist kein Anstieg der relativen Streulichtintensität zu verzeichnen. Am Anfang der Messung wurden im Falle A und B Enzyme zugegeben, die die Amplifizierung ausgelöst haben. Eine Zugabe von Mononukleotidtriphosphat unterblieb in der Blindprobe.

- 15 Es handelt sich in beiden Fällen in Fig. 1 a und Fig. 1 b um eine AmpliScribe™ SP6-Reaktion (Epicentre Technologies) - das ist eine kommerziell erhältliche Amplifizierung von RNA durch Transkription - bei einer Reaktionstemperatur von 39° C.

Komponenten	Volumen	Finalkonzentration		
		Kurve A/ B/ C	Kurve A	Kurve B Kurve C
ATP (100 mM)	2 / 2 / 0 µl	2,8 mM	2,3 mM	0 mM
CTP (100 mM)	2 / 2 / 0 µl	2,8 mM	2,3 mM	0 mM
GTP (100 mM)	2 / 2 / 0 µl	2,8 mM	2,3 mM	0 mM
UTP (100 mM)	2 / 2 / 0 µl	2,8 mM	2,3 mM	0 mM
DTT (100 mM)	4 µl	5,6 mM	4,6 mM	5 mM
AmpliScribe SP6 Enzymlösung	4 µl			
Wasser	47 / 63 / 63 µl			

1. April 1998

40267 11.11.98 sigw/kj

10x SP6 Reaktionspuffer	7 µl	1x	0,8x	0,9x
Kontroll Template DNA (0,5 µg/µl)	2 µl	1 µg	1 µg	1 µg
<b>Totalvolumen</b>	<b>72 / 88 / 89 µl</b>			

In Fig. 2 a ist ein Diagramm, das eine Vergleichsmessung zwischen einer Fluoreszenzmessung nach dem Stand der Technik und der erfindungsgemäßen Streulichtmessung umfaßt, dargestellt. Die Meßpunkte der erfindungsgemäßen Streulichtmessung wurde mit vollen Punkten dargestellt, während die Fluoreszenzmessung nach TaqMan mit Kreisen dargestellt ist. Es ist gut erkennbar, daß durch beide Methoden die Amplifizierung nachgewiesen werden kann.

Die Versuchsbedingungen für die erfindungsgemäße Streulichtmessung war wie folgt:

Komponenten	Vol./Reaktion	Finalkonz./Reaktion
ATP (10 mM)	1 µl	200 µM
CTP (10 mM)	1 µl	200 µM
GTP (10 mM)	1 µl	200 µM
TP (10 mM)	1 µl	200 µM
Primer A	variabel	0,1 µM
Primer B	variabel	0,1 µM
aq DNA Polymerase (5U/µl)	0,5 µl	2,5 U

Komponenten	Vol./Reaktion	Finalkonz./Reaktion
Wasser	variabel	
10x PCR Puffer	5 µl	1x
Template DNA	variabel	ca. 0,25 µg/Reaktion
<b>Totalvolumen</b>	<b>50 µl</b>	
Cyclingbedingung:	95 °C	120 s

95 °C	20 s	
60 °C	30 s	
72 °C	60 s	40 x Zyklen

- Nach jeweils fünf Zyklen wird eine Probe beim Ende des 72° C-Schrittes für die
- 5 Streulichtmessung entnommen und mit 50 µl Wasser verdünnt.

In Fig. 2 b ist ein Diagramm dargestellt, das eine Vergleichsmessung zwischen einer Fluoreszenzmessung durch Interkalationsfarbstoff nach dem Stand der Technik und der erfindungsgemäßen Streulichtmessung zeigt. Diese Vergleichsmessung wurde mit dem Interkalator PicoGreen ausgeführt:

- 10 Es wurden identische Proben wie bei der Streulichtintensitätsmessung nach Fig. 2 a verwendet, jedoch nur 2 µl der Reaktionslösung, verdünnt mit 60 µl Wasser und 20 µl PicoGreen (1:20 Verdünnung) Lösung. Eine Anregung erfolgte bei 480 nm und die Detektion bei 525 nm. Es ist deutlich zu sehen, daß auch hier der Nachweis erbracht wird, daß die PCR-Reaktion geklappt hat.

- 15 In Fig. 3 ist ein schematischer Aufbau eines Ausführungsbeispiels der erfindungsgemäßen Vorrichtung mit einer Probe dargestellt. Die Probe 1 wird mittels einer Quelle 2 angeregt. Das von der Quelle emittierte Licht wird durch Monochromatoren 18 geleitet und mittels einer Linse 21 auf die Probe fokussiert. Das Streulicht wird mittels der Linse 21' über den Monochromator 18' an die PIN-Diode 16, die als
- 20 Detektionseinrichtung eingesetzt wird, weitergegeben. An die Detektionseinrichtung ist eine Steuereinheit 17 angeschlossen, die die Signale auswertet und aufzeichnen läßt.

- In Fig. 4 ist ein schematischer Aufbau eines Ausführungsbeispiels der erfindungsgemäßen Vorrichtung mit einer Vielzahl von Proben 1 bzw. Probenträgern 15 und einer Abscanneinrichtung dargestellt. Probenträger 15 sind in einem Probenfeld 1
- 25 angeordnet. Eine Anregungseinrichtung, hier ein Anregungslaser, emittiert Licht und regt

1. April 1998



über eine Linse bzw. Mikroskopobjektiv 21 eine Probe Px an. Das gestreute Licht wird über die Linse 21 und die Glasscheibe 4 an die Detektionseinrichtung 13 weitergegeben und dort erfaßt. Die Detektionseinrichtung ist an einer Steuereinheit 17 angeschlossen. Diese Steuereinheit steuert eine Abscanneinrichtung 14, die das Probenfeld 1 bewegen  
5 kann.

Im Betrieb gibt die Steuereinrichtung einen Steuerimpuls an die Abscanneinrichtung und veranlaßt diese, eine spezielle Probe in den Fokusbereich der Linse 21 zu bewegen. Danach wird eine Messung vorgenommen, der Meßwert erfaßt und gespeichert und daraufhin durch ein weiteres Steuersignal der Steuereinheit 17 die Abscanneinrichtung angesteuert, die eine nächste Probe in den Fokusbereich der Linse 21 fährt, wo jetzt ebenfalls eine Messung stattfindet. So können die Proben nacheinander und bevorzugt zyklisch erfaßt und gemessen werden.

In Fig. 5 ist ein schematischer Aufbau eines Ausführungsbeispiels der erfindungsgemäßen Vorrichtung mit einer Vielzahl von Proben bzw. Probenträgern und  
15 Lichtwellenleitern dargestellt. Hier ist die Detektionseinrichtung 13 über Lichtwellenleiter 22 mit den Proben 1 verbunden. Über die Lichtwellenleiter wird sowohl das Anregungslicht übertragen als auch das Streulicht erfaßt. Die Detektionseinrichtung gibt die erfaßten Streulichtsignale an die Steuereinrichtung 17 weiter, wo sie verarbeitet und gegebenenfalls zwischengespeichert werden.

20 Es würde somit eine Vorrichtung und ein Verfahren zur Detektion, insbesondere Online-Detektion, einer Amplifizierung einer DNA- und/ oder RNA-Sequenz in einer Probe bereitgestellt, wobei eine Bewertung der Amplifizierung der DNA- und/ oder RNA-Sequenz in der Probe aufgrund eines Streulichtsignals der Probe erfolgt. Dieses Verfahren und diese Vorrichtung zur Quantifizierung von DNA und RNA Sequenzen  
25 können im Online-Betrieb einfacher und effizienter als die Verfahren und Vorrichtungen des Standes der Technik eingesetzt werden.



1. April 1998

40267

40267 19  
S/gw/kl

---

### BEZUGSZEICHENLISTE

---

- |    |                                  |
|----|----------------------------------|
| 1  | Probe                            |
| 2  | Quelle, insbesondere Lichtquelle |
| 12 | Einrichtung zur Anregung         |
| 13 | Detektionseinrichtung            |
| 14 | Abscanneinrichtung               |
| 15 | Probenträger                     |
| 16 | PIN-Diode                        |
| 17 | Steuereinheit                    |
| 18 | Monochromator                    |
| 19 | Spiegel                          |
| 20 | Glasplatte                       |
| 21 | Linse                            |
| 22 | Lichtwellenleiter                |

---

PATENTANSPRÜCHE

---

1. Verfahren zur Detektion, insbesondere Online-Detektion, einer Amplifizierung einer DNA- und/ oder RNA-Sequenz in einer Probe (1)
- 5   dadurch gekennzeichnet, daß
- eine Bewertung der Amplifizierung der DNA- und/ oder RNA-Sequenz in der Probe (1) aufgrund eines Streulichtsignals der Probe (1) erfolgt.
2. Verfahren nach Anspruch 1 dadurch gekennzeichnet, daß die Probe (1) durch eine Quelle (2) angeregt wird, wobei die Quelle (2) eine Lichtquelle, insbesondere eine
- 10   Lampe, ein Laser oder eine Leuchtdiode ist.
3. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche dadurch gekennzeichnet, daß das Streulichtsignal zur Streulichtintensität korrespondiert.
4. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche dadurch gekennzeichnet, daß die Probe Verunreinigungen enthält, insbesondere daß fremde DNA- und/oder RNA-
- 15   Sequenzen in der Probe vorhanden sind.
5. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche dadurch gekennzeichnet, daß für bekannte Ausgangs- oder Endkonzentrationen von Produkten oder Edukten eine
- ~~quantitative Bestimmung der Produkte und/oder Edukte erfolgt.~~
- 
6. Vorrichtung zur Quantifizierung einer Amplifizierung einer DNA- und/ oder RNA-
- 20   Sequenz in einer Probe (1) gemäß einem der Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, umfassend
- eine Einrichtung (12) zur Anregung der Probe (1)

1. April 1998

40267 16- S/gw/RI 2

eine Detektionseinrichtung (13)

dadurch gekennzeichnet, daß

durch die Detektionseinrichtung (13) ein Streulichtsignal aus der Probe (1) detektierbar ist.

- 5 7. Vorrichtung nach Anspruch 6 dadurch gekennzeichnet, daß die Einrichtung (12) zur Anregung eine Lichtquelle umfaßt, insbesondere eine Lampe, einen Laser oder eine Leuchtdiode umfaßt.

- 10 8. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 6 oder 7 dadurch gekennzeichnet, daß die Detektionseinrichtung (13) einen Photomultiplier und/ oder eine CCD-Kamera und/ oder eine Diode umfaßt, insbesondere eine Avalanche-photodiode und/ oder mindestens eine PIN-Diode (16).

9. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 6 bis 8 dadurch gekennzeichnet, daß weiter eine Abscanneinrichtung (14) vorgesehen ist.

- 15 10. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 6 bis 9 dadurch gekennzeichnet, daß mehrere Proben-träger (15), insbesondere Microtiterplatten oder Kapillaren, vorgesehen sind.

11. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 9 bis 10 dadurch gekennzeichnet, daß die Proben-träger (15) mit der Abscanneinrichtung (14) abgescannt werden können.

12. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 9 bis 11 dadurch gekennzeichnet, daß die Abscanneinrichtung (14) einen bevorzugt beweglichen Spiegel (19) umfaßt, über den ein

- 20 Abtaststrahl der Abscanneinrichtung (14) gerichtet werden kann.

13. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 6 bis 12 dadurch gekennzeichnet, daß die Einrichtung (12) zur Anregung so ausgestaltet ist, daß die Proben-träger (15) großflächig

1. April 1998

40267

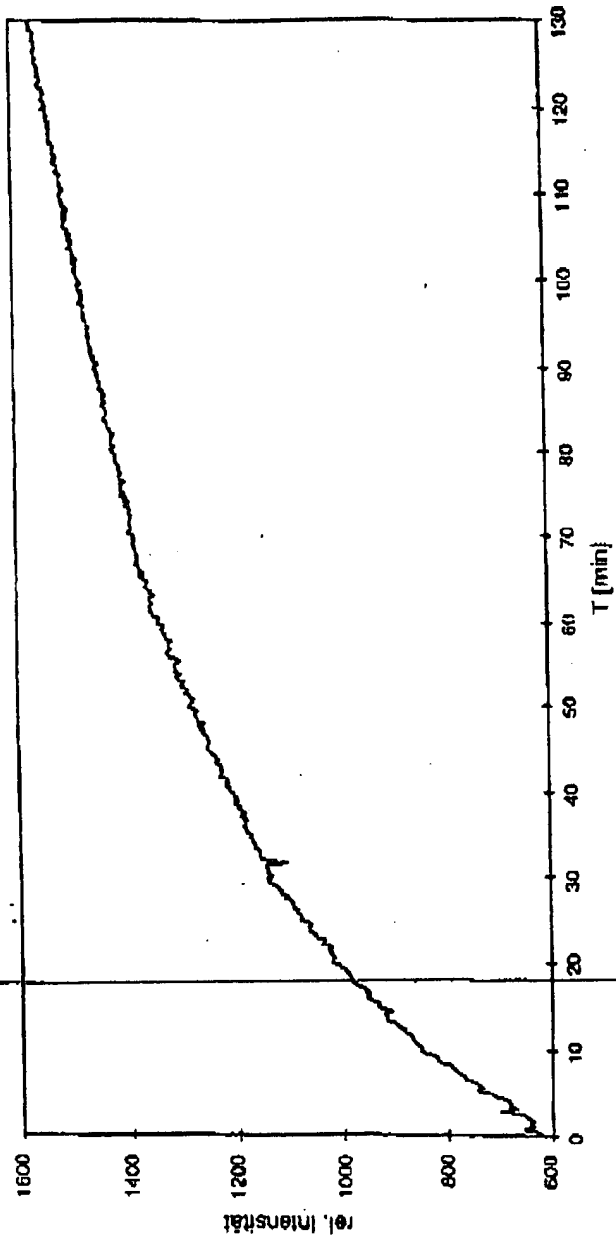
40267 22  
S/gw/kl

anregbar sind und die zu den einzelnen Probenträgern (15) korrespondierenden Streulichtsignale durch die Detektionseinrichtung (13) einzeln erfassbar sind.

14. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 6 bis 13 dadurch gekennzeichnet, daß die Detektionseinrichtung (13) mindestens zwei einzelne Detektoren umfaßt, wobei durch die  
5 einzelnen Detektoren unterschiedliche Streulichtsignale erfassbar sind.

15. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 6 bis 14 dadurch gekennzeichnet, daß weiter eine Steuereinheit (17) vorgesehen ist, zu der Signale übertragbar sind, die zu den erfaßten Streulichtsignalen korrespondieren und diese von der Steuereinheit auswertbar sind.

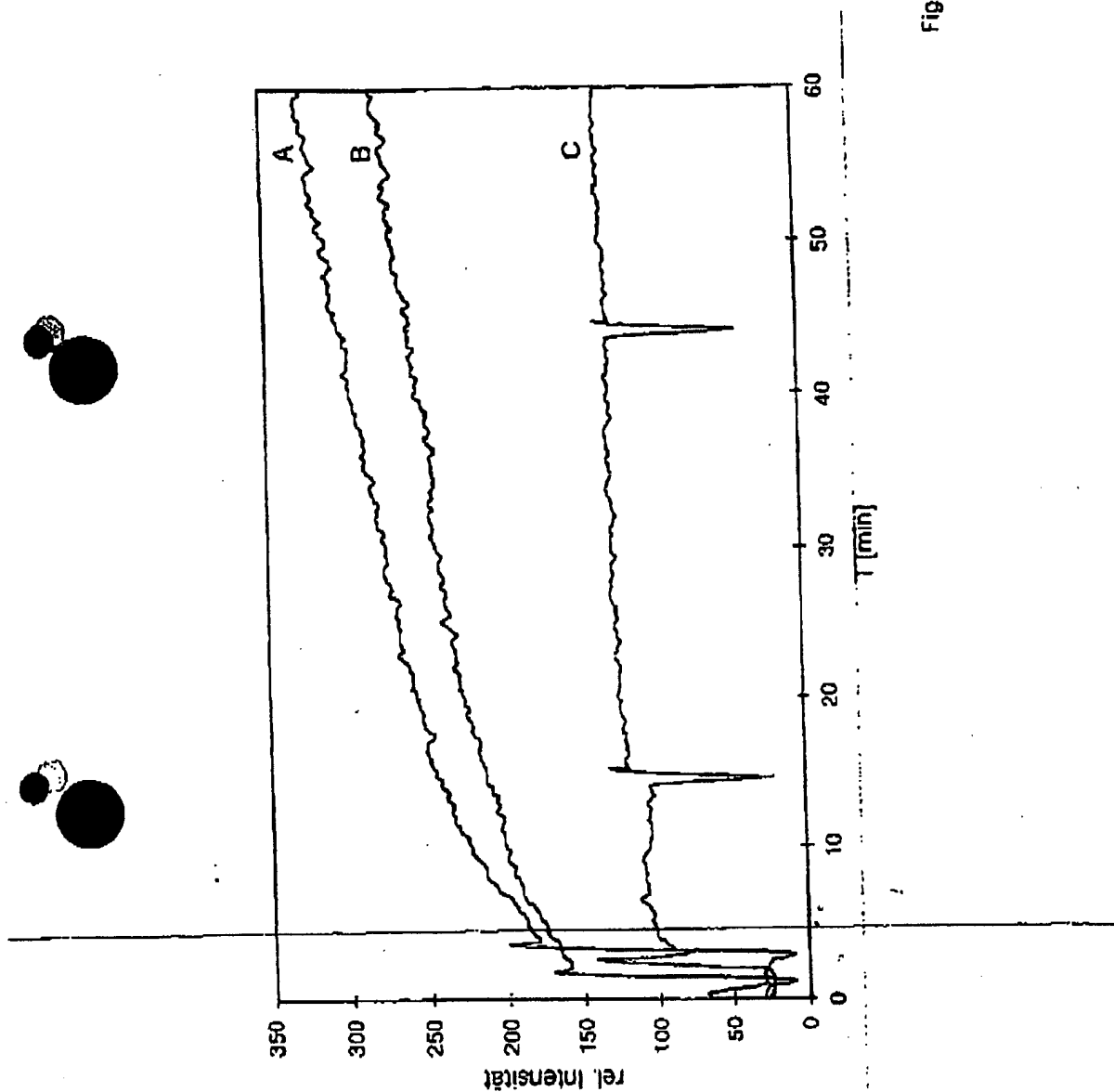
10 16. Verwendung einer Vorrichtung zur Streulichtmessung zur Quantifizierung einer Amplifizierung einer DNA- und/ oder RNA-Sequenz in einer Probe (1) gemäß einem der Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5.



**Ex. 13**

M 900879924

Fig. 1b



N 98099925

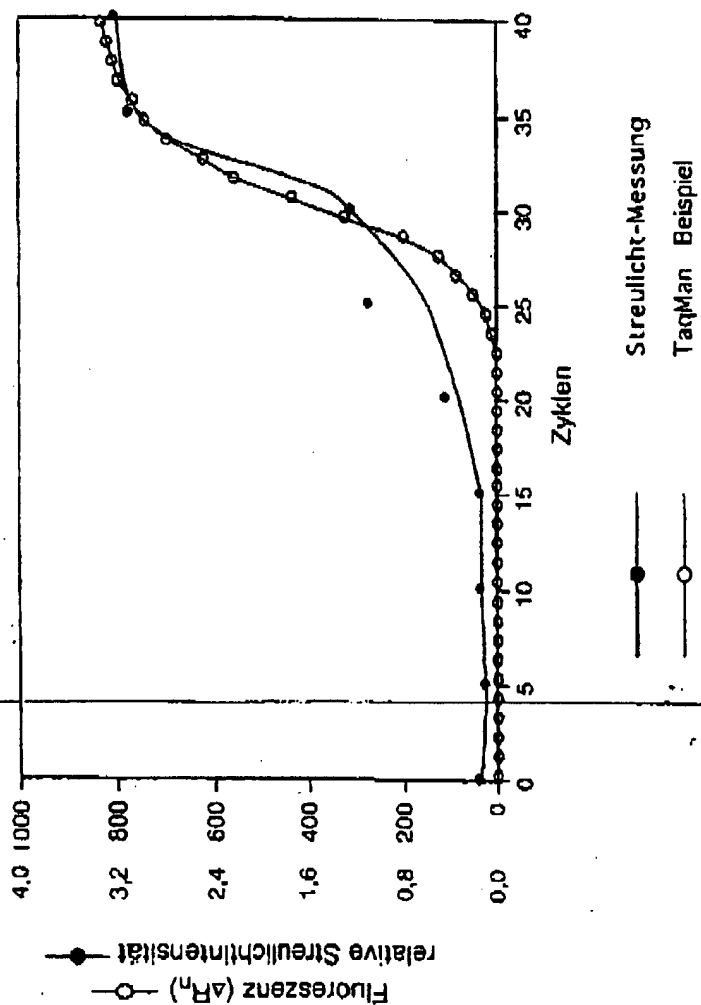
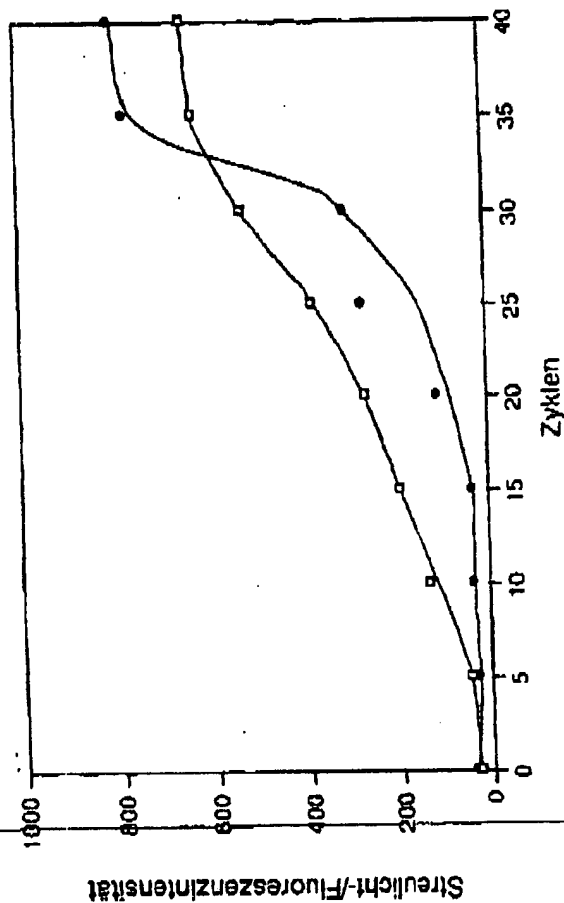


Fig. 2a

N 300879026

Fig. 2a

Fluoreszenzmessung mit Hilfe von PicoGreen





19900727

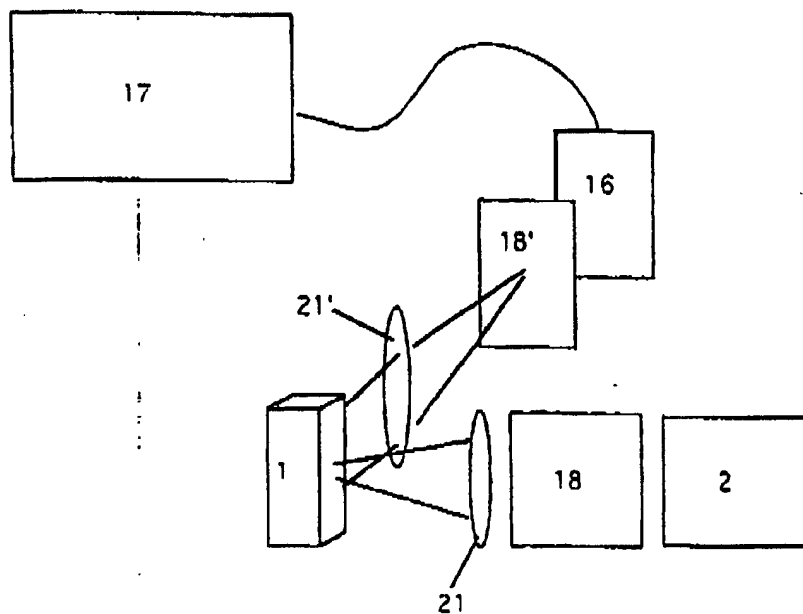


Fig. 3

19800928

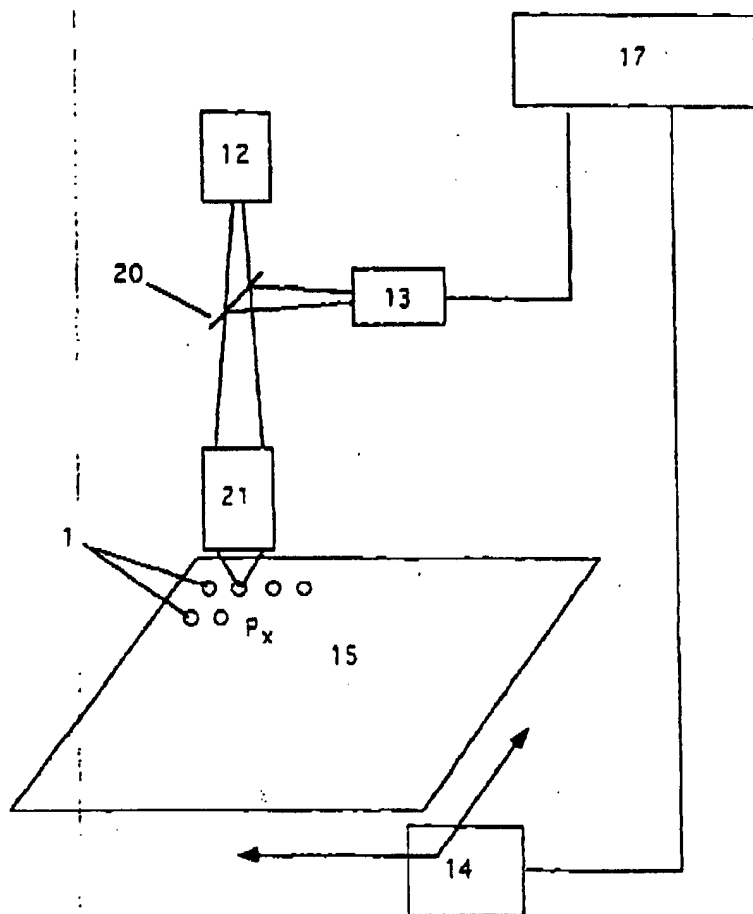


Fig. 4

1950000002

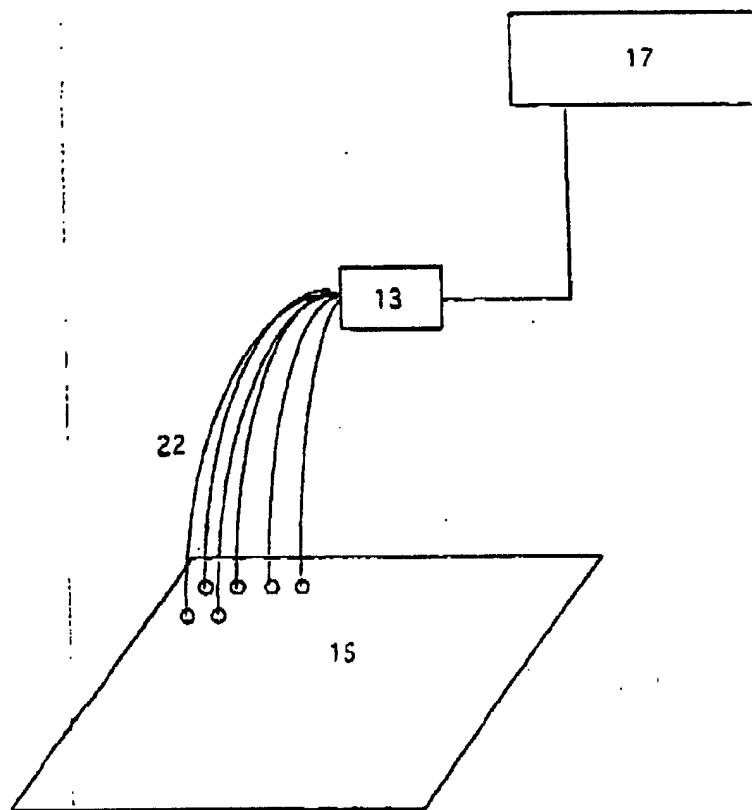


Fig. 5

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☒ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER: \_\_\_\_\_**

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**